



Attorney's Docket No. 038779/271509

DFW

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE


In re: Moon et al. Confirmation No.: 6451
Appl No.: 10/720,662 Group Art Unit: 1648
Filed: November 24, 2003 Examiner: Lucas, Zachariah
For: PRE-S PROTEIN OF HEPATITIS B VIRUS (HBV) AS AN ADJUVANT AND
A COMPONENT OF HBV VACCINE

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

SUBMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

To complete the requirements of 35 U.S.C. § 119, enclosed is a certified copy of Korean priority Application No. 10-2001-0029002, filed May 25, 2001.

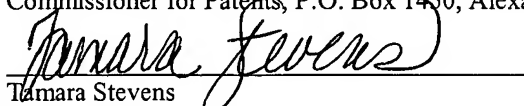
Respectfully submitted,


J. Scott Young
Registration No. 45,582

CUSTOMER NO. 00826
ALSTON & BIRD LLP
Bank of America Plaza
101 South Tryon Street, Suite 4000
Charlotte, NC 28280-4000
Tel Charlotte Office (704) 444-1000
Fax Charlotte Office (704) 444-1111

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to:
Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on December 2, 2004


Tamara Stevens



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**

출원 번호 : 10-2001-0029002
Application Number

출원 년 월 일 : 2001년 05월 25일
Date of Application MAY 25, 2001

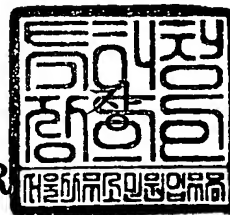
출원인 : (주)두비엘
Applicant(s) DOBEEL CO., LTD



2004 년 11 월 10 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2001.05.25
【발명의 명칭】	비형 간염바이러스의 재조합 프리 에스 단백질 및 제조방법
【발명의 영문명칭】	RECOMBINANT PRE S PROTEIN OF HEPATITIS B AND PREPARING METHOD OF THE SAME
【출원인】	
【명칭】	(주)두비엘
【출원인코드】	1-2001-017972-1
【대리인】	
【성명】	송만호
【대리인코드】	9-1998-000261-1
【포괄위임등록번호】	2001-025155-2
【대리인】	
【성명】	김원호
【대리인코드】	9-1998-000023-8
【포괄위임등록번호】	2001-025154-5
【발명자】	
【성명의 국문표기】	문홍모
【성명의 영문표기】	MUN,HONG MO
【주소】	서울특별시 강남구 역삼동 780-37
【국적】	US
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김기용
【성명의 영문표기】	KIM,KI YONG
【주민등록번호】	601018-1051128
【우편번호】	463-500
【주소】	경기도 성남시 분당구 구미동 63 까치마을 402동 204호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	염정선
【성명의 영문표기】	YUM,JUNG SUN

【주민등록번호】	620417-2002311
【우편번호】	463-010
【주소】	경기도 성남시 분당구 정자동 110 한솔마을 115동 202호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	안병철
【성명의 영문표기】	AHN,BYUNG CHEOL
【주민등록번호】	700912-1351213
【우편번호】	463-500
【주소】	경기도 성남시 분당구 구미동 88 까치마을 201동 704호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이수영
【성명의 영문표기】	YI,SU YOUNG
【주민등록번호】	760709-2031517
【우편번호】	151-050
【주소】	서울특별시 관악구 봉천동 672-11
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	서문영
【성명의 영문표기】	SEOMUN,YOUNG
【주민등록번호】	720114-1167935
【우편번호】	461-160
【주소】	경기도 성남시 수정구 신흥동 10 주공아파트 108동 408호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박지희
【성명의 영문표기】	PARK,JI HEE
【주민등록번호】	761221-2332711
【우편번호】	137-130
【주소】	서울특별시 서초구 양재동 10-32
【국적】	KR

【미생물기탁】

【미생물기탁】

【기탁기관명】 유전자은행
【수탁번호】 KCTC 0987BP
【수탁일자】 2001.04.16

【미생물기탁】

【기탁기관명】 유전자은행
【수탁번호】 KCTC 1004BP
【수탁일자】 2001.05.14

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 8
【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인
 송만호 (인) 대리인
 김원호 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20 면	29,000 원
【가산출원료】	14 면	14,000 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	0 항	0 원
【합계】	43,000 원	

【감면사유】 소기업 (70%감면)

【감면후 수수료】 12,900 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통 2.미생물기탁증명서_2통[추후제출]
 3.소기업임을 증명하는 서류_1통[추후제출]

【요약서】**【요약】**

본 발명은 B형 간염바이러스의 재조합 pre S 단백질 및 그의 제조방법에 관한 것으로, B형 간염바이러스 pre S1 및 pre S2 유전자를 포함하는 재조합백터 및 상기 재조합백터로 형질전환된 사카로마이세스 세레비지아 형질전환주를 제공한다. 또한 본 발명은 B형 간염바이러스 백신 및 B형 간염바이러스 진단시약을 제공한다. 본 발명의 재조합 pre S 단백질은 강한 항체형성능을 가지고 있으며, 동물독성이 없어 의약적인 용도로 활용할 수 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】

B형 간염바이러스, 표면항원, pre S1, pre S2, S항원

【명세서】

【발명의 명칭】

비형 간염바이러스의 재조합 프리 에스 단백질 및 제조방법 {RECOMBINANT PRE S PROTEIN OF HEPATITIS B AND PREPARING METHOD OF THE SAME}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 pIL20-pre S 벡터의 구조를 도시한 것이고,

도 2는 형질전환주 배양액을 SDS-PAGE하여 재조합 pre S 단백질의 발현을 확인한 것이고,

도 3은 형질전환주 배양액을 항-preS 항체로 웨스턴블롯을 실시한 결과를 도시한 것이고

도 4는 본 발명의 재조합 pre S 단백질 SDS-PAGE 사진과 웨스턴 블롯사진이고,

도 5는 본 발명의 재조합 pre S 단백질을 HPLC로 분석한 그래프이고,

도 6은 본 발명의 B형 간염바이러스 백신을 마우스에 접종하여 면역원성을 측정한 결과를 도시한 것이고,

도 7은 본 발명의 B형 간염바이러스 백신을 랫트에 접종하여 면역원성을 측정한 결과를 도시한 것이고,

도 8은 본 발명의 B형 간염바이러스 진단시약으로 B형 간염바이러스 항체를 진단한 결과를 도시한 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <9> 본 발명은 B형 간염바이러스의 재조합 pre S 단백질 및 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 B형 간염바이러스의 표면항원 pre S를 발현하는 재조합 효모, 재조합 pre S 단백질의 정제방법, 및 재조합 pre S 단백질을 이용한 백신 및 진단시약에 관한 것이다.
- <10> B형 간염바이러스는 헤파드나비리디(Hepadnaviridae)라는 DNA 바이러스로 일차적으로 간세포에 감염하여 증식하고, 혈액을 통해 다른 세포에 감염하여 증식한다.
- <11> B형 간염환자의 90 %는 자연적으로 치유되거나 바이러스에 대한 항체가 생기고, 그외 약 5 내지 10 %는 만성감염으로 진행되어 감염이 지속된다. 대부분의 경우 증상이 없는 보균상태로 유지되지만, 그중 10 내지 30 %는 만성간염으로 발병하여 간경화증이나 간암으로 진행된다.
- <12> B형 간염바이러스에 감염되면 급성간염으로 진행되고, 강력한 다수항체 (polyclonal antibody)가 형성되어 자연적으로 치유된다. 자연적 치유에는 다수특이적 CTL(Cytotoxic T lymphocyte) 반응과 강력한 세포성면역 반응이 관련되어 있다. 즉 다양한 바이러스 단백질에 특이적으로 반응하여 치유되는 것이다. 반면에 만성보균자가 되는 사람들은 올리고클로날 항체만이 형성되고, CTL 반응도 없거나 약하며, 일부 제한적인 항원에만 반응하게 된다. 이러한 사실은 HBV 형질전환 마우스를 이용한 동물실험에서 HBV-특이적 CTL에 의해 B형간염바이러스 증식이 억제됨을 보임으로서 입증되었다.
- <13> B형 간염바이러스의 표면 단백질(envelop protein)은 일반적으로 3 부분으로 나뉜다. 혈청형에 따라 108 내지 119개의 아미노산으로 구성된 pre S1부분, 55개의 아미노산으로 이루어진

pre S2부분, 226개의 아미노산으로 이루어진 S부분이다. 이 세 절편이 서로 다르게 결합되어 세 종류의 바이러스 표면항원을 형성하게 되는데, S부분만 포함하는 S형, pre S2와 S부분을 포함하는 M형, pre S1, pre S2 와 S부분 모두를 포함하는 L형이다. 세가지 형태의 표면항원을 정량적으로 비교하면, S형이 가장 많고 M형과 L형은 전체 표면항원의 2 내지 5 %에 해당하는 적은 양만이 포함된다.

- <14> 현재까지 이용 가능한 모든 HBV 예방백신은 주 구성분으로 S 항원만을 포함하고 있다. 그러나 pre S 부분이 강한 면역원성을 갖고 있으므로 S 항원보다 빠른 시간에 항체를 형성하며(S 항원에 비하여 약 20주이상 빠름), 백신항원으로 사용시 면역회수를 줄일 수 있고, 기존 백신에 항체가 생기지 않는 무반응자에서도 항체형성이 가능함이 동물실험으로 입증되었다. 또한 바이러스 감염시 간세포에 부착하는 부위가 pre S 부분에 있으므로 이에 대한 항체는 바이러스를 중화시킬 수 있을 뿐만 아니라 새로운 간세포의 감염을 예방할 수 있다.
- <15> 상기한 장점에도 불구하고 pre S 단백질은 대량으로 생산할 수 있는 재조합 클론을 개발하지 못하여 백신으로의 활용에 제약이 있었다. 동물세포(CHO세포)에서 전체 표면단백질을 발현하는 경우 pre S항원의 발현이 가능하나 가격이 비싸고, 주로 S항원이 많이 발현되므로 S항원 대비 pre S항원의 비중이 1-3 %로 낮아서 적정량의 pre S항원을 확보하기가 어렵다. 또한, B형 간염바이러스 만성보균자의 혈청에서 정제하는 경우에도 역시 pre S항원이 5 % 미만으로 적은 양을 포함한다.
- <16> 현재 간염치료제로 이용되고 있는 것으로 인터페론(Interferon)과 라미부딘 (Lamivudine)이 있다. 인터페론은 실질적으로 B형 간염에 대한 치료율이 20 내지 25 % 정도에도 미치지 못하고, 투약군의 약 10 %가 더 이상 치료를 진행할 수 없을 정도로 심각한 부작용을 나타낸다. 또한 인터페론은 가격이 비싸고 재발위험이 있으며, 주사제 형태이므로 사용에 불편이 있다.

반면, 라미부딘은 핵산 유도체로, 급성간염환자에서는 40 내지 70 %의 상당한 효과를 보이나, 만성간염환자의 경우 사용에 제약이 있다. 또한 1년 내에 약 20 내지 30 %, 2년에 약 40 % 정도로 빠르게 내성을 갖는 바이러스가 나타나고 있는 등의 문제점이 있다.

<17> 따라서, B형 간염바이러스를 치료 또는 예방하기 위하여 체액성 면역(humoral immunity)과 세포성 면역(cell mediated immunity)을 모두 유도할 수 있도록, B형 간염바이러스의 다양한 항원(epitope: preS1, preS2, S)을 모두 포함하는 백신이 필요한 실정이다. 또한 저가의 재조합 pre S 항원을 수득하여 백신 제제화과정에서 가장 효능이 좋은 비율로 pre S와 S 항원량을 포함하는 백신의 개발이 요구된다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<18> 따라서, 본 발명은 B형 간염바이러스의 pre S 단백질을 진핵생물에서 용이하게 발현시킬 수 있는 재조합 벡터를 제공하는 것을 목적으로 한다.

<19> 또한 본 발명은 B형 간염바이러스의 pre S 단백질을 발현하는 형질전환주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

<20> 또한 본 발명은 면역성을 가지는 B형 간염바이러스의 재조합 pre S 단백질을 제공하는 것을 목적으로 한다.

<21> 또한 본 발명은 재조합 pre S 단백질을 포함하는 B형 간염바이러스 예방백신 및 치료백신을 제공하는 것을 목적으로 한다.

<22> 또한 본 발명은 B형 간염바이러스 항체형성 유무를 확인할 수 있는 진단시약을 제공하는 것을 목적으로 한다.

【발명의 구성 및 작용】

- <23> 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 B형 간염바이러스의 pre S1 유전자 및 pre S2 유전자를 포함하는 재조합백터를 제공한다.
- <24> 또한 본 발명은 B형 간염바이러스의 pre S1 유전자 및 pre S2 유전자를 포함하는 재조합백터로 형질전환된 형질전환주를 제공한다.
- <25> 또한 본 발명은 사카로마이세스 세레비지아(*Saccharomyces cerevisiae*) 2805/pIL20-pre S 또는 사카로마이세스 세레비지아(*Saccharomyces cerevisiae*) 2805/pIL20-pre S(ayw)에서 발현되는 재조합 pre S 단백질을 제공한다.
- <26> 또한 본 발명은 사카로마이세스 세레비지아 2805/pIL20-pre S 또는 사카로마이세스 세레비지아 2805/pIL20-pre S(ayw)에서 발현되는 재조합 pre S 단백질을 당제거효소(glycosidase)로 처리하여 당쇄가 일부 또는 전부 제거된 재조합 pre S 단백질을 제공한다.
- <27> 또한 본 발명은 상기의 재조합 pre S 단백질을 포함하는 B형 간염바이러스 백신을 제공한다.
- <28> 또한 본 발명은 상기의 재조합 pre S 단백질을 포함하는 B형 간염바이러스 항체진단시약을 제공한다.
- <29> 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.
- <30> B형 간염바이러스에 대한 치료 및 예방을 위한 백신제조를 위하여 먼저, B형 간염바이러스에 대한 항원을 선별하고, 진행발현시스템으로 발현, 정제하였다.
- <31> 본 발명의 B형 간염바이러스에 대한 항원은 B형 간염바이러스의 표면항원인 pre S1 및 pre S2를 포함하는 pre S 단백질에 대한 pre S 유전자가 바람직하다. 상기 pre S 유전자는 B형 간염바이러스의 서브타입(subtype)에 따라 다양한 염기서열을 포함한다. 따라서, B형 간염

바이러스에 대한 항원은 B형 간염바이러스의 모든 서브타입의 pre S가 바람직하며, adr 서브타입(서열번호 1), B형 간염바이러스 ayw 서브타입(서열번호 2), adw 서브타입(서열번호 3), adw2 서브타입 및 adyw 서브타입이 더욱 바람직하고, 가장 바람직하게는 서열번호 1의 B형 간염바이러스 adr 서브타입의 pre S 유전자 또는 서열번호 2의 B형 간염바이러스 ayw 서브타입의 pre S 유전자이다.

<32> 상기의 B형 간염바이러스 pre S 유전자는 벡터에 삽입하여 재조합벡터를 제조하였다.

상기 재조합벡터는 발현숙주에 따라 다른 형태로 제조하는 것이 바람직하다. 상기 발현숙주로 는 진핵생물, 원핵생물이 있으며, 더욱 바람직하게는 효모이며, 사카로마이세스 세레비지아(*Saccharomyces cerevisiae*), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 야로이아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)가 가장 바람직하다.

<33> 본 발명의 재조합벡터 pIL20-pre S는 B형 간염바이러스 adr 서브타입의 pre S 유전자가 삽입된 것으로, pIL20-pre S 벡터의 구조는 도 1에서 나타내었고, pIL20-pre S 벡터의 상세구성은 하기 표 1에 나타내었다.

<34> 【표 1】

작용부	특성
프로모터	MFalpha1 promoter
분비신호	Killer toxin, IL-1 beta leader
절단부위	KEX2
삽입 유전자	pre S1 pre S2 유전자
터미네이터	GAPD terminator
ura 유전자	URA3

<35> 본 발명의 재조합벡터 pIL20-pre S(ayw)는 벡터에 B형 간염바이러스 ayw 서브타입의 pre S 유전자가 삽입된 것이다.

- <36> 또한 본 발명은 B형 간염바이러스의 pre S 단백질을 발현하는 형질전환주를 제공한다.
- 상기 형질전환주는 B형 간염바이러스의 pre S 유전자를 포함하는 재조합벡터로 형질전환된 것으로, 가장 바람직하게는 사카로마이세스 세레비지아(*Saccharomyces cerevisiae*) 2805/pIL20-pre S(KCTC 0987BP) 또는 사카로마이세스 세레비지아(*Saccharomyces cerevisiae*) 2805/pIL20-pre S(ayw)(KCTC 1004BP)이다. 상기 사카로마이세스 세레비지아(*Saccharomyces cerevisiae*) 2805/pIL20-pre S(KCTC 0987BP)는 서열번호 4의 pre S 단백질을 발현하고, 사카로마이세스 세레비지아(*Saccharomyces cerevisiae*) 2805/pIL20-pre S(ayw)(KCTC 1004BP)는 서열번호 5의 pre S 단백질을 발현한다.
- <37> 본 발명의 사카로마이세스 세레비지아(*Saccharomyces cerevisiae*) 2805/pIL20-pre S(KCTC 0987BP) 또는 사카로마이세스 세레비지아(*Saccharomyces cerevisiae*) 2805/pIL20-pre S(ayw)(KCTC 1004BP)는 회분발효배지(1 % 효모추출물, 2 % 펩톤, 2 % 덱스트로즈), 30 °C, 24 시간 배양하여 증식시키는 것이 바람직하고, 재조합단백질의 발현을 위해서는 배지내에 탄소원으로 갈락토스가 포함된 유가배지(1 % 효모추출물, 2 % 펩톤, 2 % 갈락토스)에서, 30 °C, 24 내지 48시간 배양하는 것이 바람직하다. 상기 형질전환주는 재조합 pre S 단백질은 배양액상으로 발현하며, 배양액(L) 당 50 내지 150 mg의 재조합 pre S 단백질을 생산한다.
- <38> 상기 배양액상으로부터 세포를 제거한 후 초미세막을 이용하여 농축과 투석을 하고, 이온교환수지와 크기차 분리를 하여 서열번호 4 및 서열번호 5의 재조합 pre S 단백질을 수득한다.
- <39> 상기의 정제방법으로 정제된 재조합 pre S 단백질은 당쇄화를 포함하여 단백질 전기영동상에서 150 kDa 내지 250 kDa으로 넓게 나타난다. 당쇄화를 효소로 제거한 다음 분자량을 확인한

결과 대략 20 kDa으로 나타났으며, 웨스턴분석 및 아미노산 분석으로 재조합 pre S 단백질임을 확인할 수 있었다.

- <40> 본 발명의 재조합 pre S 단백질(서열번호 4의 단백질, 서열번호 5의 단백질, 서열번호 6의 단백질)은 당쇄를 포함하고 있으며, 상기 당쇄는 당쇄제거효소(예를 들면, 글라이코시데이즈)로 제거할 수 있다. 본 발명의 재조합 pre S 단백질 또는 당쇄가 일부 또는 전체적으로 제거된 재조합 pre S 단백질은 B형 간염바이러스에 대하여 항원성 및 면역원성을 포함하고 있다. 따라서, 백신으로 사용할 경우, B형 간염바이러스의 감염을 예방 또는 치료할 수 있다.
- <41> 또한 본 발명은 B형 간염바이러스를 예방 및 치료할 수 있는 백신을 제공한다. 바람직하게는 본 발명의 B형 간염바이러스 백신은 재조합 pre S 단백질을 기존에 사용되고 있는 S항원 백신과 혼합하여 사용함으로써 B형 간염바이러스에 의한 급성 간염 또는 만성 간염을 효과적으로 예방 또는 치료하는 것이 좋다. 본 발명의 B형 간염바이러스 치료백신은 기존의 S 항원 : 재조합 pre S 단백질을 100 : 1 중량 비율 내지 1 : 1 중량비율로 더욱 포함할 수 있다. 가장 바람직하게는 S 항원 : 재조합 pre S 단백질이 10 : 1 내지 1 : 1 이다.
- <42> 본 발명의 B형 간염바이러스 백신은 B형 간염바이러스에 대한 예방 또는 치료백신으로 제조될 수 있으며, 통상적인 백신제조방법으로 제조되는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 무독성이며 효능이 좋은 통상의 면역보조제를 포함하는 것이다. 상기 면역보조제는 알루미늄 하이드록사이드(Aluminium Hydroxide), PAMIII가 바람직하다.
- <43> 본 발명의 B형 간염바이러스 백신은 경구용 또는 주사용으로 제조되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 주사용이다.

- <44> 또한 본 발명은 B형 간염바이러스 항체형성 유무를 확인할 수 있는 진단시약을 제공한다. 상기 B형 진단시약은 B형 간염바이러스 항체유무를 확인하고자 하는 시료에 본 발명의 재조합 pre S 단백질을 항원으로 사용하여 항원항체 반응시킨 다음 통상적인 검출방법으로 확인하는 것이다. 통상적인 검출방법은 발색법이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 방법이다.
- <45> 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- <46> [실시예 1] 재조합 pre S 단백질 발현 세포주의 제조
- <47> (1) pIL20-pre S 벡터의 제조
- <48> 재조합 벡터의 구조는 도 1에 간략하게 도시하였다.
- <49> pre S 유전자를 클로닝하기 위하여 B형 간염 바이러스 adr 서브타입(subtype) 중 한국형 변이체인 HBV 315(염기서열의 Accession No. AF286594)를 주형으로 하여 pre S 유전자를 PCR법으로 증폭하였다. 사용된 프라이머는 서열번호 7의 5' 프라이머와 서열번호 8의 3' 프라이머이다. 상기 5' 프라이머는 pre S 유전자에서 단백질이 시작되는 염기서열 2848번 위치에 특이적이고, KEX2 절단부위와 제한효소 XbaI 절단부위를 포함한다. 또한 상기 3' 프라이머는 130번 위치에 특이적이고, pre S 단백질이 끝나는 부분을 포함하며, 종결코돈(TAG)과 제한효소 BamHI 절단부위를 포함한다.
- <50> PCR은 변성(denaturation, 94 °C, 1분), 결합(annealing, 45 °C, 1분) 및 합성(polymerization, 72 °C, 1분)의 조건으로 30회 수행하였고, 그 결과 서열번호 1의 522 bp DNA

절편이 증폭되었다. 상기 PCR 산물은 제한효소 XbaI 및 BamHI으로 절단하여 접착말단 (cohesive end)화하였고, pIL20벡터의 XbaI, BamHI 절단부위에 삽입하여 발현벡터 pIL20-pre S를 제조하였다.

<51> (2) pIL20-pre S(ayw) 제조

<52> 서구에서 주로 발생하는 B형 간염바이러스 ayw 서브타입(subtype)을 주형(염기서열의 accession No. X02496)으로 상기와 동일한 방법으로 pIL20-pre S(ayw) 벡터를 제조하였다.

<53> (3) 형질전환체 제조

<54> pIL20-pre S 벡터 또는 pIL20-pre S(ayw) 벡터를 효모(*Saccharomyces cerevisiae* 2805)에 통상의 방법으로 형질전환하였다. 상기 효모(*S. cerevisiae* 2805)는 Matapep4::HIS3prb1-1.6Rcan1GAL2his3- 200ura3-52의 유전자형을 가지는 ura^- 숙주이다. 따라서, pIL20-pre S 또는 pIL20-pre S(ayw)로 형질전환된 세포주는 ura^- , ade^- 및 trp^- 선택배지(CAA-glucose)에서 배양하여 선별하였다.

<55> pIL20-pre S 벡터로 형질전환 효모는 사카로마이세스 세레비지아(*Saccharomyces cerevisiae*) 2805/pIL20-pre S라 명명하였고, 2001년 4월 16일 국제기탁기관인 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소 유전자은행(KCTC)에 기탁번호 KCTC 0987BP로 기탁하였다. pIL20-pre S(ayw)벡터로 형질전환 효모는 사카로마이세스 세레비지아(*Saccharomyces cerevisiae*) 2805/pIL20-pre S(ayw)라 명명하였고, 2001년 5월 8일 국제기탁기관인 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소 유전자은행(KCTC)에 기탁번호 KCTC 1004BP로 기탁하였다.

<56> [실시에 2] 재조합 pre S 단백질의 발현

<57> 사카로마이세스 세레비지아 2805/pIL20-pre S를 회분발효배지(1 % 효모추출물, 2 % 펩톤, 2 % 포도당)에서 30 °C로 24시간정도 배양하고, 600 nm에서 OD값이 20 내지 30에 도달했을 때 탄소원으로 갈락토스가 포함된 유가배지(1 % 효모추출물, 2 % 펩톤, 2 % 갈락토스)를 서서히 첨가하면서 다시 24시간 배양하여, 발현유도체인 갈락토스에 의하여 preS 단백질의 발현을 유도하였다. 상기 배양액 20 내지 30 ul을 SDS-PAGE하고, 항-pre S 단백질 항체로 웨스턴블롯을 실시하여 pre S 단백질의 발현을 확인하였다.

<58> 도 2는 본 발명의 사카로마이세스 세레비지아 2805/pIL20-pre S에서 발현된 preS 단백질을 확인한 SDS 전기영동 사진이고, 도 3은 도 2의 전기영동젤을 웨스턴블롯으로 분석한 것이다. 도 2 및 도 3에서, 1번 및 2번 레인은 단백질의 크기표시이고, 3번 레인은 pre S유전자를 포함하지 않는 pIL20백터로 형질전환된 사카로마이세스 세레비지아 2805 배양액이고, 4 및 5번 레인은 사카로마이세스 세레비지아 2805/pIL20-pre S 배양액이고, 6 및 7번 레인은 사카로마이세스 세레비지아 2805/pIL20-pre S(ayw) 배양액이다. 본 발명의 형질전환주에서 발현된 재조합 pre S 단백질은 당쇄화(glycosylation)정도가 매우 심하여 SDS-PAGE상에서 150-250 kDa 크기로 넓게 나타났다.

<59> [실시예 3] 재조합 Pre S 단백질의 생산

<60> 1. 발효

<61> 재조합 pre S단백질 생산균주를 10 L 규모 발효조에서 배양하였다. 종균은 기본배지(0.6 % 카사미노산, 2 % 글루코스, 1 x 이스트 니트로젠 베이스)에서 25 ml, 500 ml 플라스크로 계대 배양하였다.

<62> 회분발효배지(1 % 효모추출물, 2 % 펩톤, 2 % 덱스트로즈)에서 36시간 배양한 후 글루코스의 소진여부를 글루코스 어세이키트로 확인하고, 유가배지(1 % 효모추출물, 2 % 펩톤, 2 % 갈락토스)를 서서히 첨가하면서 36시간동안 배양하여 pre S 단백질 발현을 유도하였다. 이때 세포의 밀도는 600 nm에서 OD값이 50 정도였으며, pre S단백질의 농도는 50 내지 60 mg/L이었다.

<63> 2. 정제

<64> 2-1. 수득 및 여과단계

<65> 재조합 pre S 단백질은 형질전환 효모에서 발현되어 배양액으로 분비된다. 배양액을 비연속적 원심분리(discontinuous centrifuge)하여 배양세포를 제거한 다음, 분리된 배양액을 0.45 um크기의 두라포어 막(Durapore membrane)에 수회 미세여과 하였다.

<66> 2-2. 초미세 여과단계

<67> 상기 미세여과된 배양액을 분자량 절편(Molecular weight cut-off)값이 30 kDa인 초미세 여과를 통하여 농축(Ultrafiltration)과 희석(Diafiltration)을 수행하였다.

<68> 2-3. 이온교환 크로마토그래피

<69> 상기 초미세 여과한 여과물을 25 mM 아세테이트 완충액(pH4.5)로 평형된 SP-세파로즈 FF 컬럼에 흘려주고, 같은 완충액으로 컬럼을 세척한 다음, 소듐클로라이드 농도구배 (0.2 M NaCl)로 용출시켰다.

<70> 2-4. 크기차 분리단계

<71> 상기 이온교환 크로마토그래피로 분리한 용액을 다시 초미세여과를 통해 농축한 후 세파크릴 S-300 젤 여과컬럼에 넣고, PBS(Phosphate buffered saline solution, pH 7.0)를 상기 컬럼에 흘려주어 용출시켰다. 용출분획 중 재조합 pre S 단백질을 포함하는 분획[Kav = 0.440 -

0.475, $K_{av} = V_e - V_o/V_t - V_o$, V_e : 단백질의 용출부피, V_o : 블루덱스트란 (Blue dextran)의 용출부피, V_t : 컬럼의 총부피]을 모아서 0.22 mm 필터를 통과시킨 다음 냉동보관하였다.

<72> 하기 표 2는 본 발명의 재조합 preS 단백질의 정제과정 중 각 단계별 정제수율을 나타낸 것이다.

<73> 【표 2】

단계	총 단백질	총 pre S 단백질	특이활성도(mg preS/mg protein)	정제수율	정제도 (fold)
여과단계	309,440 mg	347.8 mg	0.00112	100 %	1
초미세여과단계	14,780 mg	336.4 mg	0.02276	96.7 %	20.3
이온교환 크로마토그래피	360 mg	235.5 mg	0.65417	67.7 %	584.1
크기차 분리	157.9 mg	155.43 mg	0.98486	44.7 %	878.9

<74> 도 4는 본 발명의 정제된 재조합 pre S 단백질의 SDS-PAGE 사진(A)과 웨스턴블롯사진(B)을 나타낸 것이다. 1번 레인은 정제된 재조합 pre S 단백질이고, 2번 레인은 당쇄(glycosylation)가 제거된 재조합 pre S 단백질이다. 상기 당쇄 제거는 N-글리코시데이즈 F(N-Glycosidase F, Calbiochem)으로 실시하였고, 상기 N-글리코시데이즈는 당단백질(N-linked glycoprotein)의 다수 만노스 구조(high mannose structure)와 하이브리드 올리고사카라이드(hybrid oligasaccharide)를 절단하는 효소이다. 당쇄 제거 후 재조합 pre S 단백질은 분자량이 대략 20 kDa로 나타났다.

<75> [실험예 1] 재조합 pre S 단백질의 물리화학적 성질

<76> 상기 실시예 3에서 정제한 재조합 pre S 단백질의 N-말단 아미노산 서열을 분석하였다. 서열 분석은 단백질 서열분석 시스템 (Procise cLC 492??Applied Biosystems)으로 결정하였고, pre S 유전자 염기서열에서 유추된 아미노산서열과 비교하였다.

<77> 표 3은 본 발명의 재조합 pre S 단백질 서열과 pre S 유전자 염기서열에서 유추된 아미노산서열을 비교한 것으로, 두 서열이 동일하였다. 표 3의 ND는 확인되지 않은 것을 의미한다.

<78> 【표 3】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
재조합 pre S 단백질	Met	Gly	Gly	Trp	Ser	Ser	Lys	Pro	ND	Gln	Gly	Met	Gly	Thr
유추된 아미노산 서열	Met	Gly	Gly	Trp	Ser	Ser	Lys	Pro	Arg	Gln	Gly	Met	Gly	Thr

<79> 또한 실시예 3의 재조합 pre S 단백질의 정제도를 확인하기 위하여 HPLC를 실시하였다. 컬럼은 TSK G3000SW를 사용하였고, PBS상에서 1 ml/min 유속으로 실시하고 214 nm에서 검출하였다.

<80> 도 5는 본 발명의 재조합 pre S 단백질의 HPLC 그래프를 나타낸 것으로, 그래프상에 하나의 피크로 나타나 다른 물질의 오염되지 않은 높은 순도의 재조합 pre S 단백질임을 확인할 수 있었다.

<81> [실험예 2] 재조합 pre S 단백질의 항원성 확인

<82> 실시예 3의 재조합 pre S 단백질의 항원성을 확인하기 위하여 pre S2부분의 펩타이드를 항원으로 하여 제작된 항-B형 간염 바이러스 pre S2항체를 이용하여 웨스턴블롯하였다.

<83> 재조합 pre S 단백질은 항체와 반응하여 150 내지 250 kDa 크기에서 나타나며, N-글리코시데이즈 F (N-Glycosidase F, Calbiochem)를 처리하여 일부 당쇄를 제거한 경우 약 20 kDa에서 나타났다. 따라서 효모에서 발현, 정제된 재조합 pre S 단백질은 항원성을 유지하고 있으며, 당쇄가 제거된 재조합 pre S 단백질도 항원성을 유지함을 확인할 수 있었다.

<84> [실험예 3] 재조합 pre S 단백질의 면역반응 확인

- <85> 재조합 pre S 단백질이 항체 형성능을 알아보기 위하여 100 ug의 재조합 pre S 단백질을 토끼에 0, 2, 6주의 간격으로 3회에 걸쳐 근육주사하고, 10일 후에 채혈하여 항 재조합 pre S 단백질에 대한 항체를 분리하였다. 상기 항 재조합 pre S 단백질항체에 대하여 재조합 pre S 단백질로 웨스턴블롯분석을 실시한 결과 면역반응이 일어남을 확인할 수 있었다.
- <86> 따라서 재조합 pre S 단백질은 성공적으로 항체를 유도하며, B형 간염의 감염예방과 치료에 유효한 백신제조에 이용될 수 있음을 알 수 있었다.
- <87> [실시에 4] 백신
- <88> 실시에 3의 재조합 pre S 단백질 10 ug을 알루미늄 하이드록사이드(Aluminium Hydroxide) 0.8 mg에 흡착시켜 백신을 제조하였다. 그 외에 첨가물로는 방부제로 티모로살(Thimerosal)이 0.01 w/v%, 완충용액으로 모노베이직 소듐 포스페이트, 다이베이직 소듐포스페이트가 이용되었다.
- <89> [비교예 1]
- <90> 실시에 3의 재조합 pre S 단백질 10 ug을 단독으로 백신제조하였다.
- <91> [비교예 2]
- <92> 실시에 3의 재조합 pre S 단백질 10 ug을 강력한 면역보조제인 CFA(Complete Freud's adjuvant)와 혼합하여 백신으로 제조하였다.
- <93> [실험예 4] 면역실험-마우스실험
- <94> 실시에 4, 비교예 1, 및 비교예 2의 백신 10 ug을 각각 Balb-c마우스에 0, 2, 4주 간격으로 근육주사하였고, 첫 접종 후 30일째에 채혈하여 ELISA법으로 항 재조합 pre S 단백질에 대한 항체형성을 관찰하였다.

<95> 도 6은 본 발명의 B형 간염바이러스 백신을 마우스에 주사하여, 항체형성을 확인한 것으로, ●는 비교예 1을 투여한 실험군, ○는 실시예 4를 투여한 실험군, ▼는 비교예 2를 투여한 실험군에 대한 항체형성도를 나타낸 것이다. 실시예 4의 백신은 마우스에서 항체형성을 유도하였으며, 면역보조제없이 재조합 pre S 단백질만을 투여한 경우(비교예 1)에도 마우스에서 항체형성을 유도하므로 재조합 pre S항원은 면역성이 높음을 관찰할 수 있었다.

<96> [실험예 5] 면역실험-랫트

<97> 실시예 4의 백신과 인체에 무해함이 확인된 리포펩타이드인 PAMIII로 제제화된 백신을 제조하여 효능을 비교하였다. 양성실험군으로 동물에 사용하는 강력한 면역보조제인 CFA(Complete Freud's adjuvant)를 사용한 실험군과 음성실험군으로 항원을 투여하지 않은 실험군이 비교되었다. 백신 20 ug를 각각 Sprague Dawley 랫트에 0, 2, 4주 간격으로 근육주사하였고, 첫 접종 후 30일째에 채혈하여 ELISA법으로 항 재조합 pre S 단백질에 대한 항체형성을 관찰하였다.

<98> 도 7은 본 발명의 B형 간염바이러스 백신을 랫트에 주사하여, 항체형성을 확인한 것으로, ●는 실시예 4의 백신, ○는 양성시험군, ▼는 PAMIII를 면역보조제로 사용한 백신에 대한 항체형성을 나타낸 것이고, ▽는 음성실험군에서 항체형성도를 나타낸 것이다. 실시예 4의 백신은 랫트에서도 항체형성을 유도하였으며, 인체에 무해함이 증명된 리보펩타이드인 PAMIII도 pre S항원에 대한 항체를 유도하므로 면역보조제로 사용가능성이 있음이 관찰되었다.

<99> [실험예 6] 독성실험- 단회투여독성시험(급성)

<100> 실시예 4의 백신을 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/(몸무게)kg로 ICR마우스에 복강주사하였다. 상기 실험군은 백신이 주사되지 않은 음성대조군과 2주간 마우스의 몸무게, 임상적 변화, 병리학적 소견을 관찰하였으나, 차이가 나타나지 않았다. 따라서 실시예 4의 백신은 마우스에 대

한 급성독성이 없음을 확인할 수 있었으며, 최대량(2 mg/kg)을 투여한 실험군에서도 한 마리도 죽지 않았으므로 LD₅₀를 결정할 수 없었다.

<101> [실험예 7] 독성실험- 반복투여 독성시험(아급성)

<102> 실시예 4의 백신을 0, 50, 100, 200 ug/(몸무게)kg씩 1주일에 5회, 4주간 Sprague Dawley 랫트에 피하주사한 후 변화를 관찰하였다. 백신이 주사되지 않은 대조군과 비교하여 실험예 6의 SD 랫트에서는 몸무게, 임상적 변화, 병리학적 소견등에 차이가 나타나지 않았다. 또한 요검사(urinalysis test), 혈액검사(hematological test)에서도 대조군과 실험군에 차이를 보이지 않았다. 따라서 실시예 4의 백신은 랫트에서 아급성 독성이 없음을 확인하였다.

<103> [실험예 8] 독성실험-피부자극시험

<104> 뉴질랜드 흰토끼의 등에 양쪽으로 두 군데에 2.5 cm x 2.5 cm크기로 털을 제거하고, 그 중 한 쪽은 피하주사바늘을 이용하여 피부각질층을 벗겨내고, 나머지는 그대로 두었다. 실시예 4의 백신 0.5 mg을 수술용 거즈에 묻혀 반창고로 양쪽에 붙여두었다. 대조군은 PBS를 같은 방법으로 시술하였다. 피부에 접촉 24, 48, 72시간 후 Draize Scoring System에 따라 처치된 부위를 관찰하고 약제의 안전성을 결정하였다.

<105> 재조합 pre S 백신이 처리된 뉴질랜드 흰토끼 피부는 대조군과 비교하여, 홍반(erythema), 흑반(eschar), 부종(edema)과 같은 임상적 변화가 관찰되지 않았고, 이로써 실시예 4의 백신이 피부독성이 없음을 확인하였다.

<106> [실시예 5] 항체진단시약

<107> 실시예 3의 재조합 pre S 단백질을 항원으로 이용하여 B형 간염바이러스에 대한 항체진단용 키트를 제작하였다. 재조합 pre S 단백질을 500 ng/ml로 준비하여 96 웰 플레이트(Nunc

maxisorp)에 웰 당 100 ul를 넣고 37 °C에서 2시간 또는 4 °C에서 17 내지 20 시간 동안 코팅하였다. 코팅된 플레이트는 PBST(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄)로 3회 세척하고, 1 % BSA(Bovine Serum Albumin)를 웰 당 100 ul씩 넣고 37 °C에서 1시간동안 블로킹시켰다. 여기에 마우스에서 제작된 항 preS2 항체를 양성대조군으로 웰 당 100 ul씩 넣고 37 °C에서 90분간 반응시켰다. 같은 방법으로 B형 간염바이러스 항체양성 및 항체음성인 사람의 혈청, 음성대조군(PBS)을 100 ul씩 넣어 반응시켰다. 2차 항체로 HRP(Horseradish Peroxidase)가 결합된 마우스 항체(anti-mouse IgG-HRP)를 희석하여 웰 당 100 ul씩 넣어 37 °C에서 40분간 반응시키고, OPD(o-Phenylenediamine)를 기질로 첨가하여 상온에서 발색을 유도한 다음 3 M HCl로 발색반응을 정지시킨 후 492 nm에서 OD값을 측정하였다.

<108> 도 8은 본 발명의 B형 간염바이러스 항체진단에 있어서 재조합 pre S 단백질의 면역반응성을 나타낸 것으로, B형 간염바이러스에 대한 반응성이 양성대조군과 유사하였고, B형 간염바이러스 항체를 포함하는 혈청을 식별할 수 있었다.

【발명의 효과】

<109> 상기에 언급한 바와 같이, 본 발명은 재조합 pre S 단백질을 효모에서 대량으로 발현, 정제시킬 수 있으며, B형 간염바이러스에 대한 항체를 형성시켜 B형 간염바이러스를 예방 및 치료할 수 있다. 또한 재조합 pre S 단백질을 백신으로 제조하여 B형 간염바이러스에 대한 급성 간염 및 만성간염을 치료할 수 있다. 또한 정제된 재조합 pre S 단백질은 B형 간염바이러스 항체진단시약에 활용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

B형 간염바이러스의 pre S1 유전자 및 pre S2 유전자로 이루어진 pre S 유전자를 포함하는 재조합백터.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 pre S 유전자는 B형 간염바이러스 adr 서브타입의 pre S 유전자, B형 간염바이러스 ayw 서브타입의 pre S 유전자, B형 간염바이러스 adw 서브타입의 pre S 유전자, B형 간염바이러스 adw2 서브타입의 pre S 유전자 및 B형 간염바이러스 adyw 서브타입의 pre S 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되어진 pre S 유전자인 재조합백터.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 재조합 백터는 서열번호 1의 pre S 유전자를 포함하는 pIL20-pre S 또는 서열번호 2의 pre S 유전자를 포함하는 pIL20-pre S(ayw)인 재조합백터.

【청구항 4】

B형 간염바이러스의 pre S1 유전자 및 pre S2 유전자를 포함하는 재조합백터로 형질전환된 형질전환주.

【청구항 5】

제 4항에 있어서, 상기 형질전환주는 사카로마이세스 세레비지아(*Saccharomyces cerevisiae*), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 야로이아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)인 것을 특징으로 하는 형질전환주.

【청구항 6】

제 4항에 있어서, 상기 형질전환주는 사카로마이세스 세레비지아(*Saccharomyces cerevisiae*) 2805/pIL20-pre S(KCTC 0987BP) 또는 사카로마이세스 세레비지아(*Saccharomyces cerevisiae*) 2805/pIL20-pre S(ayw)(KCTC 1004 BP)인 것을 특징으로 하는 형질전환주.

【청구항 7】

사카로마이세스 세레비지아(*Saccharomyces cerevisiae*) 2805/pIL20-pre S 또는 사카로마이세스 세레비지아(*Saccharomyces cerevisiae*) 2805/pIL20-pre S(ayw)에서 발현되는 재조합 pre S 단백질.

【청구항 8】

제 7항에 있어서, 상기 재조합 pre S 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열 또는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 pre S 단백질.

【청구항 9】

사카로마이세스 세레비지아 2805/pIL20-pre S 또는 사카로마이세스 세레비지아 2805/pIL20-pre S(ayw)에서 발현되는 재조합 pre S 단백질을 당제거효소(glycosidase)로 처리하여 당쇄가 일부 또는 전부 제거된 재조합 pre S 단백질.

【청구항 10】

상기 7항 또는 상기 9항의 재조합 pre S 단백질을 포함하는 B형 간염바이러스 백신.

【청구항 11】

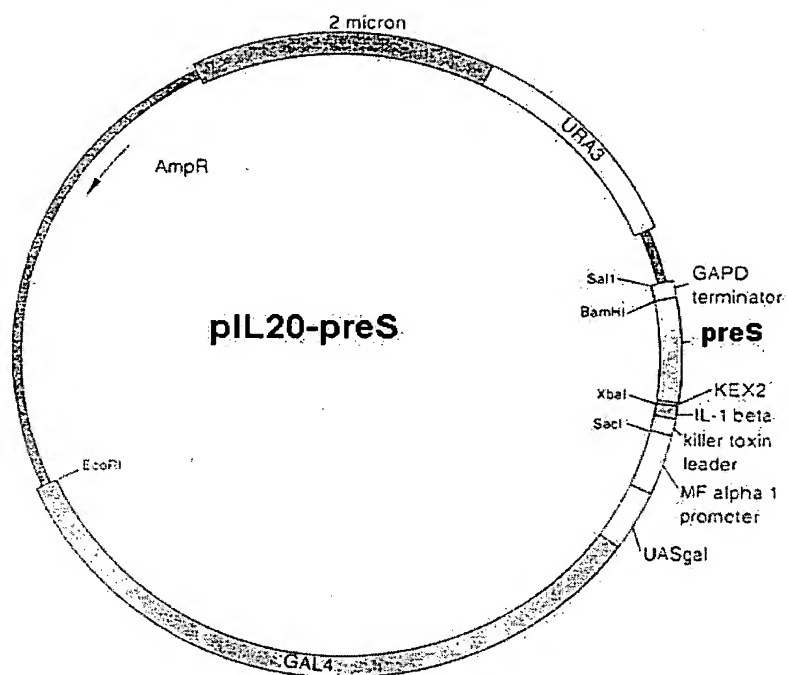
제 10항에 있어서, 상기 B형 간염바이러스 백신은 B형 간염바이러스의 표면항원인 S단백질을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 B형 바이러스 백신.

【청구항 12】

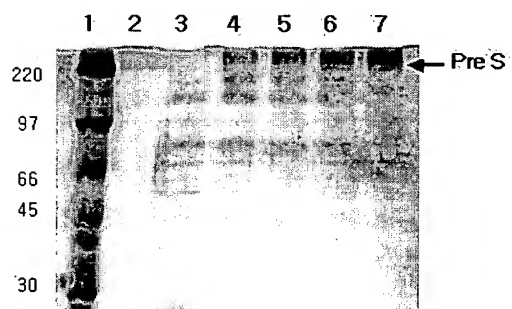
상기 7항 또는 상기 9항의 재조합 pre S 단백질을 포함하는 B형 간염바이러스 항체진단시약.

【도면】

【도 1】



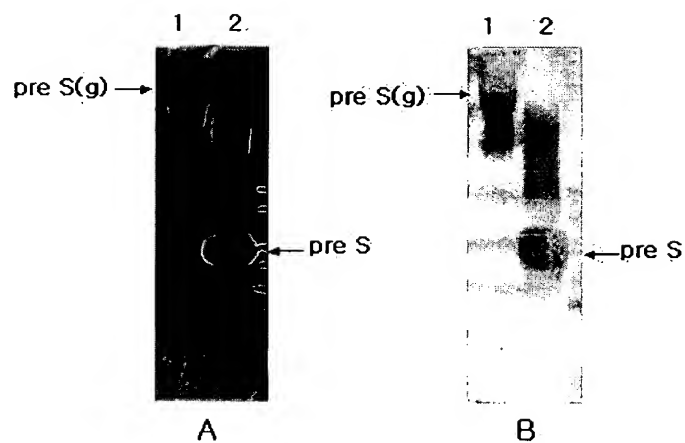
【도 2】



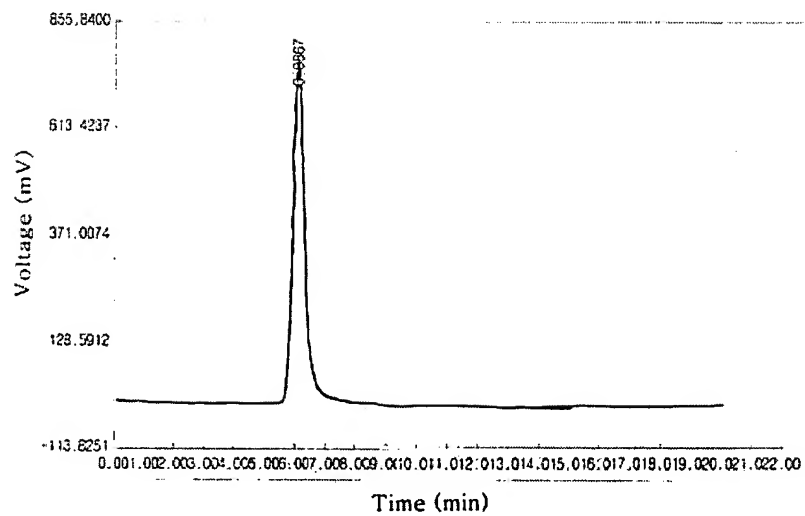
【도 3】



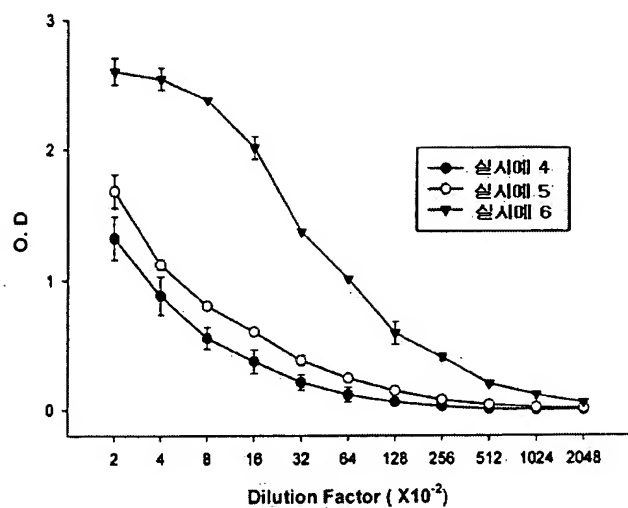
【도 4】



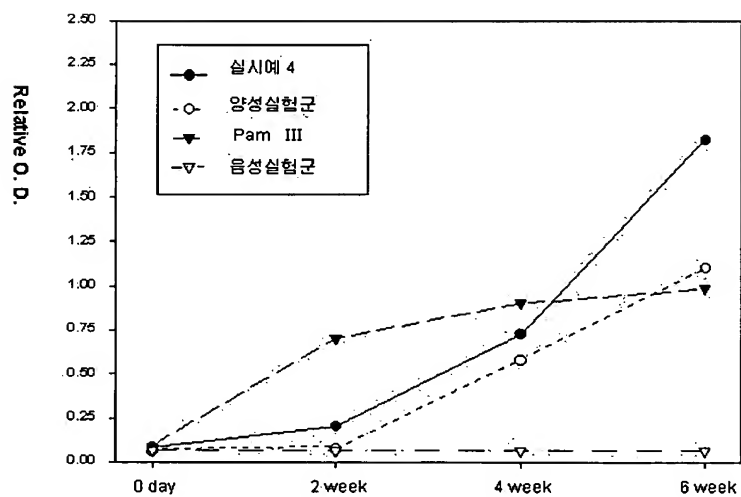
【도 5】



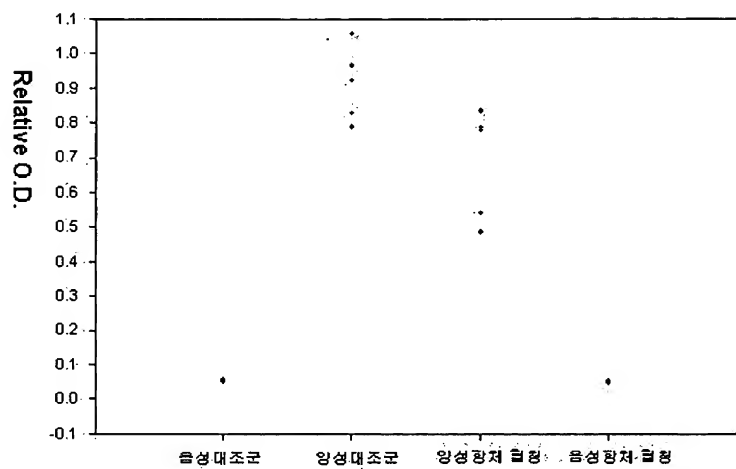
【도 6】



【도 7】



【도 8】



【서열목록】

<110> Dobeel Corporation <120> Recombinant pre S protein of hepatitis B and

preparing method of the same <160> 8 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1

<211> 522 <212> DNA <213> HBV(adr subtype HBV 315) pre S1S2 gene <400> 1

atgggaggtt ggtcttccaa acctcgacaa ggcatgggga cgaatctttc tgttcccaat 60

cctctgggat tctttccga tcaccagttg gaccctgcgt tcggagccaa ctcaaacaat 120

ccagattggg acttcaaccc caacaaggat cactggccag aggcaaatca ggtaggagtg 180

ggagcattcg ggccagggtt caccacacca cacggcggtc ttttggggtg gagccctcag 240

gctcagggca tattgacaac agtgccagca ggcctcctc ctgcctccac caatcggcag 300

tcaggaagac agcctactcc catctctcca cctctaagag acagtcatcc tcaggccatg 360

cagtggaact ccaccacatt ccaccaagct ctgctagatc ccagagttag ggcctatat 420

tttctgctg gtggctccag ttccggaaca gtaaaccctg ttccgactac tgcctcaccc 480

atatcgtaa tcttctcgag gactggggac cctgcaccga ac 522 <210>

2 <211> 522 <212> DNA <213> HBV(ayw subtype) pre S1S2 gene <400> 2

atgggaggtt ggtcttccaa acctcgacaa ggcatggggc agaatctttc caccagcaat 60

cctctgggat tctttccga ccaccagttg gatccagcct tcagagcaaa caccgcaaat 120

ccagattggg acttcaatcc caacaaggac acctggccag acgccaacaa ggtaggagct 180

ggagcattcg ggctgggatt caccacacca cacggaggcc ttttggggtg gagccctcag 240

gctcagggca tactagaaac gttgccagca aatccgcctc ctgcctctac caatcgccag 300

tcaggaaggc agcctacccc gctgtctcca cctttgagaa acatcatcc tcaggccatg 360

cagtggaact ccacaacctt ccaccaaact ctgcaagatc ccagagttag aggcctgtat 420

ttccctgctg gtggctccag ttccaggaaca gtaaaccctg ttccgactac tgtctctccc 480

atatcgtaa tcttctcgag gattggggac cctgcgctga ac 522 <210>

3 <211> 522 <212> DNA <213> HBV adw subtype pre S1S2 gene <400> 3

atgggaggtt ggtcatcaaa acctcgcaaa ggcatgggga cgaacctttc tgttcccaac 60

cctctgggat tctttccga tcatcagttg gacctgcat tcggagccaa ttcaaacaat 120

ccagattggg acttcaacc catcaaggac cactggccac aagccaacca ggtaggagtg 180

ggagcatttg ggccagggtt cactcccca cacggaggtg ttttggggtg gagccctcag 240

gctcaggga tattggccac cgtgccagcg atgcctcctc ctgcctccac caatcggcag 300

tcaggaaggc agcctactcc catctctcca cctctaagag acagtcattc tcaggccatg 360

cagtgggaatt ccacagcttt ccaccaagct ctgcaagatc ccagagtcag gggcctgtat 420

tttcctgctg gtggctccag ttcaggaaca ctcaaccctg ttccaactat tgcctctcac 480

atctcgtcaa tctcctcgag gattggggac cctgcaccga ac 522 <210>

4 <211> 174 <212> PRT <213> HBV(adw subtype) pre S1S2 protein <400> 4 Met

Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu 1 5

10 15 Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp

Pro 20 25 30 Ala Phe Gly Ala Asn Ser

Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn 35 40

45 Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Val Gly Ala Phe Gly 50

55 60 Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro

Gln 65 70 75 80 Ala Gln Gly Ile

Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro Ala Ser 85

90 95 Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro

Leu 100 105 110 Arg Asp Ser His Pro Gln

Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His 115 120
 125 Gln Ala Leu Leu Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly 130
 135 140 Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser
 Pro 145 150 155 160 Ile Ser Ser Ile
 Phe Ser Arg Thr Gly Asp Pro Ala Pro Asn 165 170
 <210> 5 <211> 174 <212> PRT <213> HBV(ayw subtype) pre S1S2 protein
 <400> 5 Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Gln Gly Met Gly Gln Asn Leu 1
 5 10 15 Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asn
 His Gln Leu Asp Pro 20 25 30 Ala Phe
 Arg Ala Asn Thr Ala Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn 35
 40 45 Lys Asp Thr Trp Pro Asp Ala Asn Lys Val Gly Ala Gly Ala Phe
 Gly 50 55 60 Leu Gly Phe Thr Pro Pro His Gly
 Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln 65 70 75
 80 Ala Gln Gly Ile Leu Glu Thr Leu Pro Ala Asn Pro Pro Pro Ala Ser
 85 90 95 Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr
 Pro Leu Ser Pro Pro Leu 100 105 110 Arg
 Asn Thr His Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His 115
 120 125 Gln Thr Leu Gln Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala
 Gly 130 135 140 Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val Asn
 Pro Val Pro Thr Thr Val Ser Pro 145 150 155
 160 Ile Ser Ser Ile Phe Ser Arg Ile Gly Asp Pro Ala Leu Asn 165

170 <210> 6 <211> 174 <212> PRT <213> HBV adw subtype pre
 S1S2 protein <400> 6 Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Lys Gly Met Gly Thr Asn
 Leu 1 5 10 15 Ser Val Pro Asn Pro
 Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro 20 25
 30 Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Ile 35
 40 45 Lys Asp His Trp Pro Gln Ala Asn Gln Val Gly Val Gly Ala Phe
 Gly 50 55 60 Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly
 Gly Val Leu Gly Trp Ser Pro Gln 65 70 75
 80 Ala Gln Gly Ile Leu Ala Thr Val Pro Ala Met Pro Pro Pro Ala Ser
 85 90 95 Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr
 Pro Ile Ser Pro Pro Leu 100 105 110 Arg
 Asp Ser His Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Ala Phe His 115
 120 125 Gln Ala Leu Gln Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala
 Gly 130 135 140 Gly Ser Ser Ser Gly Thr Leu Asn
 Pro Val Pro Thr Ile Ala Ser His 145 150 155
 160 Ile Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ile Gly Asp Pro Ala Pro Asn 165
 170 <210> 7 <211> 39 <212> DNA <213> primer <400> 7
 gtctctagac aagagaatgg gaggttggtc ttccaaacc 39 <210>
 8 <211> 37 <212> DNA <213> primer <400> 8 atcgatccc tagttcggtg
 cagggtcccc agtcctc 37